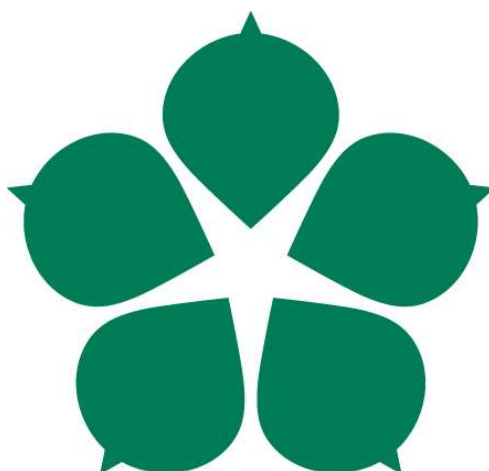


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



**Analýza pohlavních chromosomů kroupnatce jetelového
(*Chiasmia clathrata*) (Lepidoptera, Geometridae)**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Marharyta Trehubenko

Školitelka: RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D.

České Budějovice 2019

Trehubenko, M., 2019: Analýza pohlavních chromosomů kroupnatce jetelového (*Chiasmia clathrata*). [Analysis of the latticed heath (*Chiasmia clathrata*) sex chromosomes. Bc.Thesis, in Czech] – 36 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of this thesis was to identify the cause of the variability of the sex chromatin in *Chiasmia clathrata* (Geometridae). I tested several hypotheses, namely variability in the W chromosome appearance, absence of the W chromosome in some females (i.e. Z0 females), feminization by intracellular symbiont *Wolbachia* (i.e. ZZ females), and presence of extranumerary B-chromosomes. My results excluded *Wolbachia* as a potential cause of variability. I found B-chromosomes across families with (SC⁺) and without sex chromatin (SC⁻), which suggests they are not responsible for sex chromatin variability. In some nuclei of SC⁻ females, univalents occur, possibly representing either single Z or B chromosome. Finally, comparative genomic hybridization failed to detect a W chromosome, but genomic in situ hybridization highlighted the W chromosome in one family with sex chromatin (SC⁺), suggesting the existence of a neo-W system.

Finanční podpora:

Tato práce byla financována z grantu 17-13713S Grantové agentury České republiky při Entomologickém ústavu BC AV ČR.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně

přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 10.12.2019

.....
Marharyta Trehubenko

Poděkování

Hlavně bych ráda poděkovala své školitelce Magdě Zrzavé za pečlivou práci nejen při psaní rukopisu, které bylo zvláště časově náročné kvůli jazykovým korekcím. Velké díky jí patří i za všechna slova podpory a neskutečnou víru v mé schopnosti. Samozřejmě dále děkuji všem členům bobřího týmu za cenné rady a veškerou pomoc jak v průběhu experimentální, tak i písemné části mojí práce, zejména Martině Hejníčkové, Irence Hladové, Aničce Voleníkové, Martině Dalíkové a Sanderu Visserovi. Zvláštní poděkování patří Františku Marecovi za odborné konzultace. Děkuju vám všem za přijetí do takového báječného týmu a za přátelskou atmosféru, díky které jsem do laboratoře ráda chodila. Poslední dík patří mému příteli za to, že tu celou cestu stál při mně v dobrém i ve zlém.

OBSAH

1. Úvod.....	1
1.1. Evoluce pohlavních chromosomů.....	1
1.2. Pohlavní chromosomy u motýlů.....	1
1.2.1. Chromosom Z.....	3
1.2.2. Chromosom W.....	4
1.3. B-chromosomy.....	5
1.4. Sex chromatin.....	6
1.5. Bakterie rodu <i>Wolbachia</i>	7
1.6. Příklady metodických přístupů studia pohlavních chromosomů motýlů.....	8
1.6.1. Sex chromatin jako cytogenetický marker.....	8
1.6.2. Hybridizace genomových sond.....	9
1.7. Sex chromatin a pohlavní chromosomy píďalek (Geometridae).....	10
2. Cíl práce.....	11
3. Materiály a metody.....	12
3.1. Použitý hmyz.....	12
3.2. Příprava preparátů.....	12
3.2.1. Příprava chromozomálních preparátů.....	12
3.2.2 Příprava preparátů z malpighických trubic.....	13
3.3. Přípravy pro komparativní genomovou hybridizaci (CGH).....	13
3.3.1. Izolace DNA.....	13
3.3.2. Příprava celogenomových sond.....	14
3.3.3. CGH - Komparativní genomová hybridizace.....	15

3.4. Genomová in situ hybridizace – GISH.....	17
3.5. Prohlížení preparátů.....	17
3.6. Polymerázová řetězcová reakce na detekci bakterie rodu <i>Wolbachia</i>	17
4. Výsledky.....	19
4.1. Přítomnost sex chromatinu.....	19
4.2. Mitotické a meiotické chromosomy barvené DAPI.....	21
4.2. CGH a GISH.....	22
4.3. Detekci přítomnosti bakterie rodu <i>Wolbachia</i> pomocí PCR	23
5. Diskuze.....	25
5.1. Variabilita v samotné přítomnosti chromosomu W v rámci druhu <i>C. clathrata</i>	25
5.2. Variabilita ve struktuře chromosomu W s rámci druhu <i>C. clathrata</i>	26
5.3. Feminizace části samců, způsobená bakterií rodu <i>Wolbachia</i>	27
5.4. Další možné příčiny variability sex chromatinu u <i>C. clathrata</i>	28
5.4.1. B-chromosomy.....	28
5.4.2. Kryptické druhy.....	29
6. Závěr.....	30
7. Použité zdroje.....	31

1. Úvod

1.1. Evoluce pohlavních chromosomů

U živočichů s odděleným pohlavím (gonochoristů) je přítomen jeden ze dvou typů chromosomálního určení pohlaví, a to buď WZ (kde jsou heterogametickým pohlavím samice) anebo XY (heterogametičtí jsou samci). Morfologicky jsou chromosomy X a Z spíše podobné autozomům, jsou přítomné u obou pohlaví v různém počtu, zatímco Y a W jsou zpravidla odlišné od zbytku genomu a vyskytují se pouze u jednoho pohlaví (Bachtrog 2006; Steinemann a Steinemann 2005).

V současné době převládá názor, že pohlavní chromosomy vznikly z páru autozomů a to mnohokrát nezávisle u různých skupin organismů (Bachtrog 2006). Odlišení obou pohlavních chromosomů začíná tak, že jeden z partnerů získá gen determinující pohlaví (Charlesworth 1996). Časem se na tomto chromosomu objeví geny, které budou prospívat s ním spojenému pohlaví. Protože je výhodné přenášet tyto geny spolu, selekce upřednostní takové chromosomální změny, které zabrání rekombinaci mezi oběma chromosomy (Rice 1987).

Jelikož tyto „zvýhodněné“ geny budou přibývat, rozšíří se i oblast, kde spolu pohlavní chromosomy nebudou rekombinovat. V této oblasti ale budou odumírat jiné geny, protože se nemohou opravit či vyměnit s kopií na homologním chromosomu. Výsledkem je různá míra degenerace chromosomů W a Y, které obsahují velké množství repetitivních sekvencí a malé množství genů, což ale neplatí pro X a Z, protože ty v homogametickém pohlaví normálně rekombinují (Charlesworth, Charlesworth a Marais 2005; Charlesworth a Charlesworth 2000; Charlesworth 1978).

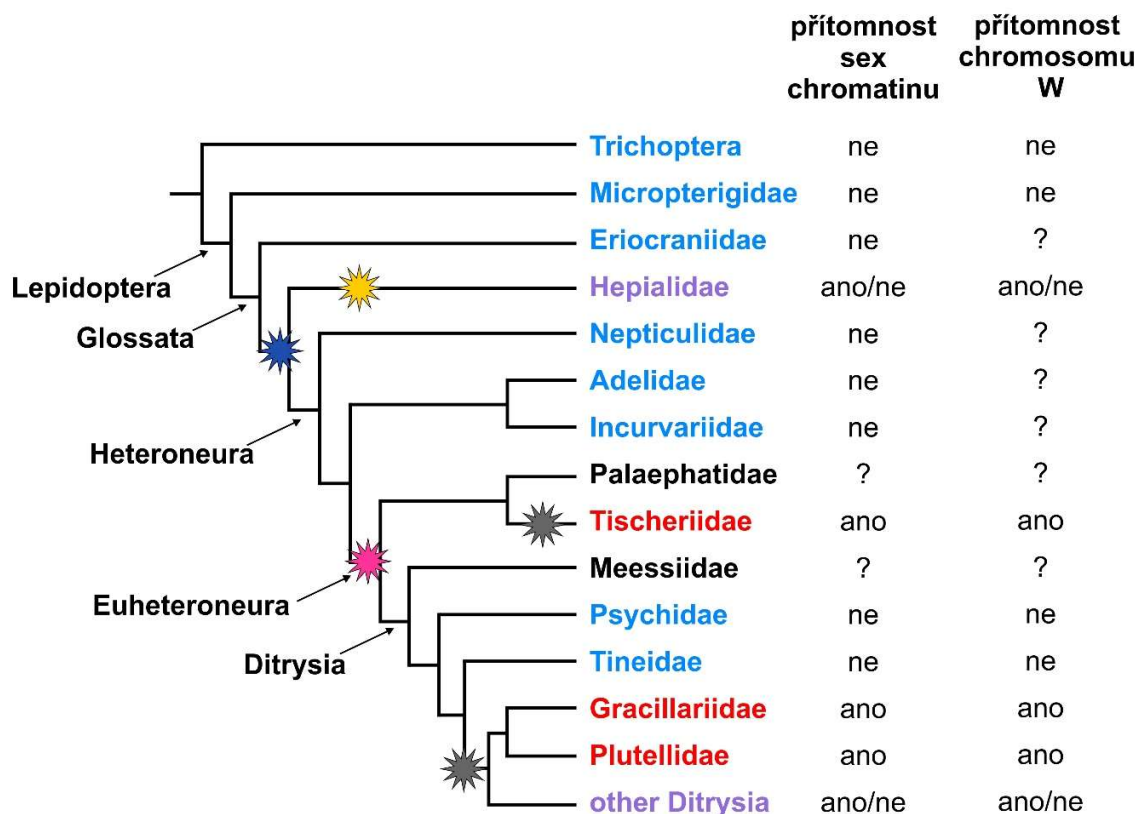
1.2. Pohlavní chromosomy u motýlů

Motýli (Lepidoptera) jsou druhově nejpočetnější skupinou organismů s chromosomálním určením pohlaví WZ/ZZ. U motýlů existují ale i jiné možnosti chromozomální konstituce, jako Z0/ZZ, kde samec zůstává ZZ, ale samička nemá chromosom W a vlastní jen jeden chromosom Z (Sahara, Yoshido a Traut 2012). Protože se tento systém nachází u bazálních motýlů i u sesterského řádu motýlů, u chrostíků (Trichoptera), předpokládá se, že systém pohlaví s

heterogametickými samičkami vznikl ještě u společného předka těchto řádů, přičemž pohlavní chromosom W vznikl později (obr. 1). Stav Z0/ZZ je tedy považován za ancestrální a systém WZ/ZZ za odvozený, přičemž u některých druhů byl chromosom W druhotně ztracen nebo vznikl systém neo-pohlavních chromosomů (Sahara, Yoshido a Traut 2012; Traut, Sahara a Marec 2008; Yoshido, Yamada a Sahara 2006; Yoshido et al. 2005).

Jak tedy došlo ke vzniku nového pohlavního chromosomu W? Touto otázkou se zabývali ve svých pracích pánové W. Traut a F. Marec, kteří popsali následující teorii. Jeden homolog z páru autozomů zfúzoval s tehdy už existujícím pohlavním chromosomem Z a takto dal vzniknout novému chromosomu, který se označoval jako neo-Z. Ten se při meióze pároval se zbylým autozomem, ze kterého tak vznikl chromosom W (Traut a Marec 1996). Alternativní teorie byla publikována Lukhtanovem (2000), podle které chromosom W vznikl z nadpočetného B-chromosomu u společného předka skupin Tischeriidae a Ditrysia. Jedna z novějších teorií naznačuje nezávislý vznik chromosomu W minimálně u dvou skupin: Tischeriidae a u odvozených Ditrysia (Dalíková et al. 2017).

Avšak všechny tyto teorie jsou postaveny na faktu, že bazální skupiny motýlů nemají chromosom W, a to na základě absence sex chromatinu v malpighických žlázách. Dnes už je ale známo, že sex chromatin není jednoznačný marker přítomnosti/absence chromosomu W. Např. ve své magisterské práci (Voleníková 2015) Anna Voleníková našla chromosom neo-W u hrotnokřídlece *Phymatopus californicus* (Hepialidae), zástupce čeledi Hepialidae, jedné z bazálních motýlích skupin, který sex chromatin neměl. To naznačuje už minimálně třetí nezávislý vznik pohlavního chromosomu W za celou historii evoluce Lepidoptera, ale hlavně ukazuje, že některé chromosomální přestavby, kterých se účastní chromosom W, mohou způsobit absenci sex chromatinu i u druhů, které tento chromosom mají.



Obr. 1: Distribuce sex chromatinu a pohlavních chromosomů u motýlů. Hvězdy ukazují potenciální vzniky chromosomu W. Šedivé hvězdy = nezávislý vznik chromosomů W u Tischeriidae a Ditrýdia po odštěpení Psychidae a Tineidae. Růžová hvězda = vznik W u společného předka Tischeriidae a Ditrýsia. Modrá hvězda = vznik W u společného předka motýlů po odštěpení nejbazálnějších Micropterigidae a Eriocraniidae. Žlutá hvězda = nezávislý vznik chromosomu W u Hepialidae (Hejníčková et al. 2019; Dalíková et al. 2017).

1.2.1. Chromosom Z

Pohlavní chromosom Z motýlů patří mezi evolučně starší pohlavní chromosom a svou strukturou je podobný autozomům. Jedná se o vysoce konzervativní chromosom mezi motýly (Lepidoptera), stejně jako Z chromosom u ptáků a X chromosom u savců (Sahara, Yoshido a Traut 2012). Obsahuje velké množství transkripčně aktivních genů (Traut, Sahara a Marec 2008). V řadě experimentů, kde se srovnávalo umístění a pořadí genů na chromosomu Z u

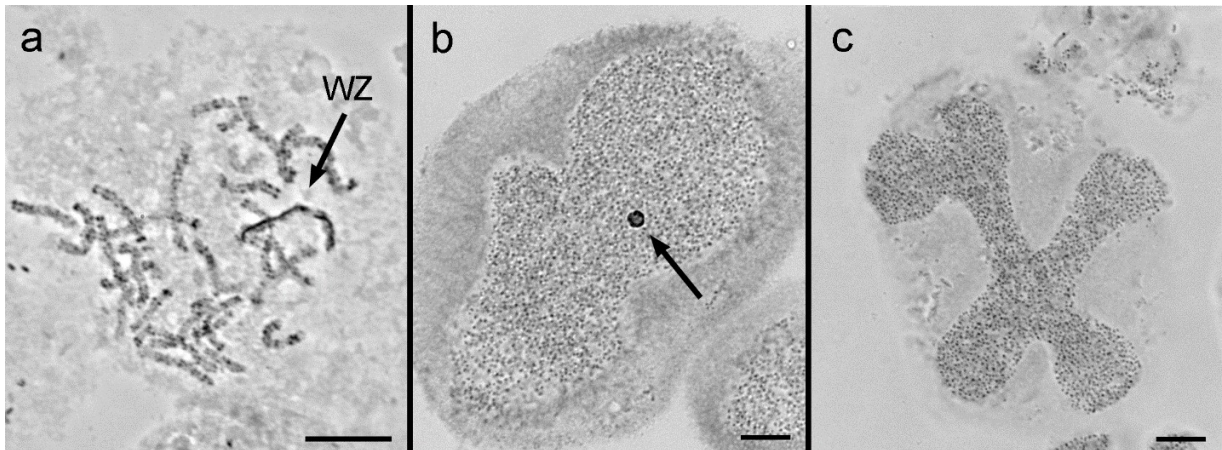
různých druhů motýlů, bylo zjištěno, že jejich syntenie je velmi zachovaná (Van't Hof et al. 2013; Beldade et al. 2009).

1.2.2. Chromosom W

Na rozdíl od chromosomu Z má chromosom W tendenci k rychlému vývoji. Z několika prací zabývajících se složením chromosomu W vyplynulo, že značnou část tohoto chromosomu tvoří repetitivní sekvence, především mobilní elementy (Traut et al. 2013; Sahara, Yoshido a Traut 2012; Fuková et al. 2007; Abe et al. 2005). V práci Vítková et al. (2007) byla porovnána struktura chromosomu W pomocí malovacích a celogenomových sond u čtyř druhů z čeledi Pyralidae (zavíječovití) - *Ephestia kuehniella* (zavíječ moučný), *Cadra cautella* (z. čokoládový), *Plodia interpunctella* (z. paprikový), a *Galleria mellonella* (z. voskový). Ukázalo se, že chromosomy W se u těchto druhů velice liší, což je způsobeno nepřítomností rekombinace v samičí meióze, takže chromosom W u motýlů podléhá urychlené molekulární divergenci, jinými slovy změně.

Na chromosomu W bylo objeveno jen malé množství genů. Nejvýznamnější z nich je gen determinující samičí pohlaví u bource morušového (*Bombyx mori*) (Kiuchi et al. 2014). Zvláštností je, že jeho expresí vzniká *Fem* piRNA, čili určení pohlaví u tohoto druhu není založeno na funkci genu kódujícího protein, ale nekódující RNA. Na druhou stranu, chromosom W nemá vždy vliv na determinaci pohlaví. Při křížení dvou poddruhů martináče pajasanového (*Samia cynthia*, Saturniidae) byli nalezeni hybridní samci s chromozomem W a neo-W a hybridní samičky, které chromosom W neměly (Yoshido, Marec a Sahara 2016), takže determinace pohlaví musí probíhat jiným způsobem, než u bource morušového.

Velké množství repetice a malé množství genů vede k tomu, že chromosom W je obvykle tvořen heterochromatinem. V meiotické profázi I, kdy se spolu párují homologní chromosomy, je často možné poznat bivalent WZ od ostatních chromosomů a chromosom W od jeho partnera, chromosomu Z (obr. 2a). Chromosom W také tvoří v polyploidních interfázních jádrech heterochromatinové tělísko, tzv. sex chromatin (obr. 2b-c).



Obr. 2: Chromosom W a sex chromatin u zavíječů. Pachytenní jádro z oocyty samice zavíječe čokoládového (*C. cautella*) s výrazným heterochromatinovým chromosomem W (a), polyploidní jádro z malpighické žlázy zavíječe moučného (*E. kuehniella*) se sex chromatinem u samice (šipka)(b) a bez sex chromatinu u samce (c). Foto Magda Zrzavá. Měřítko = 10 μ m.

1.3. B-chromosomy

B-chromosomy jsou nadpočetné chromosomy, které se vyskytují u mnoha skupin zvířat, hub a rostlin v různém počtu, často s malým nebo žádným účinkem na fenotyp. Tyto chromosomy často vznikají z nadbytečných kopií normálních, tzv. A-chromosomů, vzniklých špatným rozchodem nebo po hybridizaci dvou druhů (Douglas a Birchler 2017; Pansonato-Alves et al. 2014; Voleníková 2012). Typické pro ně je, že se nevyskytují u všech jedinců v populaci a jejich počet se může lišit i v buňkách jednoho jedince. Často neobsahují žádné geny, jsou složeny z repetitivních sekvencí a nepodléhají Mendelovým zákonům dědičnosti. Díky svému složení mohou být tvořeny heterochromatinem a pak mohou v interfázních jádrech vytvářet heterochromatinové kulaté útvary podobné sex chromatinu (Voleníková 2012). Někteří vědci podporují teorii, že je to škodlivý parazitický prvek, který zejména ve velkém počtu způsobuje snížení fitness či neplodnost (Douglas a Birchler 2017; Yoshida et al. 2011).

V některých případech se ale mohou B-chromosomy opět stát standardní složkou karyotypu. Např. u mery *Cacopsylla peregrina* (Hemiptera, Psylloidae) s chromosomální konstitucí XY bylo prokázáno, že se pohlavní chromosom Y vyvinul z nadbytečného B-chromosomu a to párováním s X univalentem a dalším fixováním v karyotypu jako chromosom

Y (Nokkala et al. 2003). Stejná situace se patrně odehrála v historii skupiny Drosophilidae (Diptera) (Carvalho 2002).

Ačkoli přítomnost B-chromosomu většinou není pohlavně specifická, v práci Yoshida et al. (2011) zjistili, že u cichlid v jezeře Viktoria měla většina jedinců B-chromosomy a u jednoho druhu se vyskytovali se pouze v samičích buňkách. B-chromosom se v tomto případě podílel na určení pohlaví nesením specifických protein-kódujících genů.

1.4. Sex chromatin

V práci Traut a Marec (1996) je uvedeno, že 81% z 238 zkoumaných druhů motýlů má v samičích interfázních buňkách heterochromatinové tělísko, které ale u samců chybí. Tento tzv. sex chromatin v polyploidních jádrech samičích buněk je složený z mnoha kopií chromozomu W. V porovnání s podobnou tvorbou sex chromatinu u savců (Barrovo tělísko, které je tvořeno inaktivovaným chromosomem X), to u motýlů nefunguje jako mechanismus kompenzace genové dávky. Obvykle se vyskytuje pouze jedno tělísko (vzácně jsou v buňce dvě nebo více) a jeho velikost závisí na ploidii buňky – čím větší je stupeň ploidie, tím větší je sex chromatin. Narozdíl od většiny motýlů, žádný z testovaných druhů chrostíků (Trichoptera), sesterského řádu motýlů s heterogametickými samicemi, neměl sex chromatin. Analýza chromosomů potvrdila, že samičky postrádají chromosom W ve svém karyotypu a chromosom Z v průběhu pachytene tvoří univalent. Chrostíci mají tedy chromosomální určení pohlaví Z/ZZ (Marec a Novák 1998).

Dlouhou dobu se sex chromatin běžně používal jako marker přítomnosti chromosomu W, protože se snadno získává z larev i dospělců, ale ukázalo se, že se na něj nelze spolehnout. Např. u hrotnokřídlece (*P. californicus*, Hepialidae) a jasoně dymnivkového (*Parnassius mnemosyne*, Papilionidae) byl detekován chromosom neo-W navzdory tomu, že samičky tohoto druhu neměly ve svých jádrech v malpighických trubicích sex chromatin (Vlašánek et al. 2017; Voleníková 2015).

Tento jev byl prokázán u mutantních linií zavíječe moučného (*E. kuehniella*, Pyralidae) připravených ozařováním. Tyto linie nesly různé chromosomální aberace zahrnující pohlavní chromosomy, např. delecii části W, translokaci části chromosomu Z na chromosom W a fúzi

chromosomu W s autosomem (Traut a Marec 1994). Tyto změny způsobily zmenšení sex chromatinu, deformaci chromatinových tělísek (oválná forma místo normální kulaté) anebo fragmentaci na víc menších zrn ve vysoce polyploidních somatických jádrech samiček WZ, případně úplnou ztrátu sex chromatinu.

1.5. Bakterie rodu *Wolbachia*

Chromosomální i molekulární determinace pohlaví může být ovlivněna vnitrobuněčnými symbionty. Nejznámější jsou bakterie rodu *Wolbachia*, které se vyskytují u mnoha druhů členovců a hlístic (Hilgenboecker et al. 2008). Odhady, jak moc je veškerý hmyz touto bakterií infikován, se pohybují se od 20% (Werren, Windsor a Guo 1995) až do 76% druhů (Jeyaparakash a Hoy 2000). U motýlů to je odhadem 70% všech druhů (Ahmed et al. 2015).

Podobně jako další vnitrobuněčné bakterie se *Wolbachia* přenáší po mateřské linii z infikované samice na potomstvo. Některé linie si vyvinuly mechanismus, jak změnit pohlaví hostitele nebo zvýhodnit samičí hostitelky, které nesou stejného symbionta. Známými mechanismy jsou cytoplazmatická nekompatibilita (při oplození neinfikované samičky anebo samičky nesoucí jiný kmen wolbachie infikovaným samcem dochází k vysoké embryonální letalitě), partenogeneze (asexuální rozmnožování, dovolující infikované samičce produkovat infikovaná vajíčka bez přítomnosti samce), zabíjení samců (infikovaní samci hynou během embryonálního vývoje) a v neposlední řadě feminizace genetických samců (LePage a Bordenstein 2013; Jeyaparakash a Hoy 2000).

Vedlejším efektem manipulace pohlavím hostitele může být ztráta pohlavního chromosomu W. Příkladem je suchozemský korýš *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Isopoda), který má systém pohlavních chromosomů WZ/ZZ. V některých liniích *A. vulgare* se vyskytuje kmen wolbachie feminizující samce, takže část samic má pohlavní chromosomy ZZ. Chromosom W existuje pouze u dcer neinfikovaných samic, zatímco jejich synové a všichni potomci feminizovaných samců mají jen chromosomy Z. Frekvence chromosomu W je tak stále nižší, až v některých liniích zmizí docela a všichni jedinci jsou ZZ. O pohlaví hostitele tak rozhoduje výhradně přítomnost wolbachie. V některých liniích *A. vulgare*, postrádajících chromosom W a zároveň obsahujících bakterii rodu *Wolbachia*, determinaci samičího pohlaví

převzal prvek f – jaderný inzert získaný horizontálním přenosem z genomu feminizující wolbachie do genomu *A. vulgare*. Vznikl tak nový pár pohlavních chromosomů WZ, zatím velice málo diferencovaných (Chebbi et al. 2019).

Příkladem ztrát pohlavních chromosomů vlivem wolbachie u motýlů je žluťásek *Eurema mandarina* (Pieridae) z japonského ostrova Tanegašima (Kageyama et al. 2017), ve kterém se vyskytuje kmen wolbachie označený wFem, ovládající feminizaci samců. Zatímco neinfikované samičky měly pohlavní chromosomy WZ, infikovaným samičkám chyběl chromosom W (systém Z0) a jejich chromosom Z byl vždy paternálního původu. Zdravým samičkám se líhlo potomstvo obojího pohlaví (samice WZ a samci ZZ), ale infikované samičky měly jen dcery s chromosomy Z0. Po vyléčení se těmto samičkám začalo líhnout potomstvo obojího pohlaví, samičky Z0 a samečci ZZ. Principem feminizace wolbachii tak zřejmě bylo odstranění maternálního chromosomu Z, kterému navíc na úplném počátku předcházela ztráta chromosomu W.

1.6. Příklady metodických přístupů studia pohlavních chromosomů motýlů

Motýli mají obvykle mnoho drobných chromosomů, které postrádají centromery, jinak řečeno jsou holokinetické (Wolf, Novák a Marec 1997). Ancestrální a nejčastější počet chromosomů motýlů je $n = 31$, ale samozřejmě existují i odchylky směrem k vyššímu či nižšímu počtu. U motýlů navíc nefungují spolehlivé proužkovací techniky, používané např. u savců, umožňující identifikovat jednotlivé chromosomy. Právě kvůli těmto charakteristikám je poměrně složité motýlí chromosomy rozlišit a studovat (Traut et al. 1999). Dále budou uvedeny metody, díky kterým se i přesto podařilo odhalit detaily chromosomální stavby motýlů.

1.6.1. Sex chromatin jako cytogenetický marker

Jak už bylo zmíněno v kapitole 1.4. (Sex chromatin), přítomnost sex chromatinu v interfázních jádrech malpighických tubic se používá jako prvotní, i když ne zcela spolehlivý marker přítomnosti chromosomu W (Traut a Marec 1996). Jeho výhodou je to, že je k dispozici u všech vývojových stádiích s výjimkou embryí a nejmenších larev, takže může být u některých druhů

použit k určení pohlaví larev, které ještě nemají patrné pohlavní orgány (Fuková et al. 2007). Dalším využitím sex chromatinu ve studiu chromosomu W je výroba celochromosomové malovací sondy pomocí laserové mikrodisekce, při které je ze speciálního preparátu tenkým laserem vyříznuto několik desítek tělísek, které jsou následně namnoženy, naznačeny a použity pro fluorescenční in situ hybridizaci (FISH) k detekci chromosomu W (Fuková et al. 2007).

1.6.2. Hybridizace genomových sond

K vizualizaci a analýze chromosomu W se mohou použít metody využívající hybridizaci celých genomů na samičí chromosomy; genomová in situ hybridizace (GISH) a komparativní genomová hybridizace (CGH). V podstatě jsou to modifikace klasické fluorescenční in situ hybridizace (FISH), které dokáží lokalizovat a identifikovat dobře diferencované pohlavní chromosomy (Traut, Eickhoff a Schorch 2001).

Metoda CGH byla využita jak při analýze pohlavních chromosomů X a Y octomilky, ryb, myši a člověka (Traut a Winking 2001; Traut et al. 1999), tak i pohlavních chromosomů Z a W u motýlů (Šíchová et al. 2013). Základní princip je založen na kompetici různě značené celogenomové samičí a samčí DNA o vazebná místa na chromosomech heterogametického pohlaví. Obě sondy budou podobně hybridizovat na autosomech, které jsou společné pro obě pohlaví. Zvýrazněny by měly být pohlavní chromosomy, chromosom Z více samčí sondou, protože se v samčím genomu DNA tohoto chromosomu vyskytuje 2x více než v samičím genomu, a chromosom W samičí sondou, protože se vyskytuje jen u samice. V ideálním případě by tak při značení samičí sondy zeleně a samčí červeně měly být po přeložení signálů obou sond autosomy žluté, chromosom Z červený a chromosom W zelený. Dosavadní výsledky CGH na motýlích chromosomech však ukazují, že zatímco sondy skutečně hybridizují rovnoměrně na autosomy, chromosom Z vypadá obvykle podobně jako autosom a podoba chromosomu W se liší u jednotlivých druhů podle toho, jestli na něm převažují sekvence přítomné jinde v genomu nebo obohacené na chromosomu W (Zrzavá et al. 2018; Dalíková et al. 2017; Vítková et al. 2007; Traut, Eickhoff a Schorch 2001). CGH tak dá použít k předběžné analýze složení chromosomu W.

Pro vizualizaci chromosomu W lze alternativně použít metodu GISH, která je založená na hybridizaci pouze samičí značené celogenomové sondy za přítomnosti nadbytku neznačené kompetitorové DNA, kterou může být samčí celogenomová DNA nebo Cot1 DNA. Výhodou je, že je možné paralelně hybridizovat další jinak značenou sondu lokalizující např. telomerické sekvence na koncích chromosomů nebo klastry genů pro ribozomální RNA (Šíchová et al. 2015; Yoshido, Yamada a Sahara 2006).

1.7. Sex chromatin a pohlavní chromosomy píďalek (Geometridae)

Píďalky (Geometridae) jsou druhově bohatá čeleď motýlů patřící do skupiny Ditrysia sdružující drtivou většinu známých motýlích druhů. Většina zkoumaných zástupců Ditrysia má chromosom W, ale byly nalezeny i druhy, které tento chromosom ztratily a mají druhotně systém pohlavních chromosomů Z0/ZZ (Traut, Sahara a Marec 2008). Píďalky jsou zvláštní tím, že u řady druhů chybí sex chromatin a často se i blízce příbuzné druhy liší počtem chromosomů (Robinson 1970, Traut a Marec 1996). To může znamenat opakované ztráty chromosomu W a/nebo vzniky neo-pohlavních chromosomů. Píďalky tak představují dobrý model pro studium evoluce pohlavních chromosomů. Předběžné výsledky z naše laboratoře ukázali, že u některých druhů se samice liší v přítomnosti a podobě sex chromatinu. Jedním z těchto druhů je i kropenatec jetelový (*Chiasmia clathrata*). Cílem této práce bylo zjistit příčinu variability v přítomnosti sex chromatinu u tohoto druhu.

2. Cíl práce

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, čím je dána variabilita sex chromatinu uvnitř druhu kroupnatce jetelového (*C. clathrata*). Proto byly sestaveny a postupně otestovány 3 hypotézy, které mohou způsobit tento fenomén:

Variabilita sex chromatinu u *C. clathrata* je způsobena

- 1) variabilitou v samotné přítomnosti chromosomu W v rámci druhu,
- 2) variabilitou ve struktuře chromosomu W v rámci druhu,
- 3) feminizací části samců způsobeném vnitrobuněčným parazitem např. bakterie rodu *Wolbachia*.

3. Materiál a metody

3.1. Použitý hmyz

Dospělé samice zkoumaného druhu pocházely z České republiky a Estonska. Samice z ČR byly nachytány na loukách v okolí Českých Budějovic (Vrbenské rybníky) a v Novohradských horách (obec Kuří, Benešov nad Černou) v době od května do září. Samice z Estonska byly poskytnuty Toomasem Tammaru, Ph.D., jedinci z roku 2018 pocházeli z neznámé lokality a jedinci z roku 2019 z lokality Karilatsi. Chycené samice byly ponechány klást vajíčka při pokojové teplotě v plastových krabičkách s živnou rostlinou (jetel luční (*Trifolium pratense*)). Housenky předposledního a posledního instaru a kukly byly použity na přípravu preparátů chromosomů a malpighických žláz. Zbytek těla byl zmražen v tekutém dusíku a uchován při -20°C pro pozdější izolaci DNA.

3.2. Příprava preparátů

3.2.1. Příprava chromozomálních preparátů

Chromosomální preparáty byly připraveny metodou „spreading“ (Traut 1976) s malými úpravami. K výrobě preparátů meiotických chromosomů byla použita ovária ze samičích kukel a larev posledního instaru. Pro přípravu preparátů mitotických chromosomů byly použity křídelní disky z larev samic předposledního a posledního instaru. Výše zmíněné orgány byly vyjmuty z těla ve fyziologickém roztoku, a následně přemístěny do hypotonického roztoku na cca 8-10 minut (při práci s ovárií byl vynechán krok s hypotonickým roztokem z důvodu zachování struktury potenciálního heterochromatinu chromosomu W). Dále byl materiál fixován v čerstvě připraveném fixačním roztoku Carnoy (99% etanol: chloroform: kyselina octová v poměru 6:3:1) po dobu 15 minut. Fixovaný materiál byl přenesen na podložní sklo (Superfrost, Menzel-Gläser, Německo) do kapky 60% kyseliny octové a macerován wolframovými jehlami až do úplného rozpuštění tkáně. Poté byl přidán na histologickou plotýnku vyhřátou na 45°C a rozprostřen po skle rovnoměrným popoháněním kapky až do skoro plného odpaření. Všechny vytvořené preparáty byly postupně odvodněny v etanolové řadě

(70%, 80% a 100% etanol, ponechány v každém cca na 1 minutu) a po uschnutí uskladněny v mrazáku při -20°C do dalšího použití.

3.2.2. Příprava preparátů z malpighických trubic

Stejně jako jiné orgány, malpighické trubice byly vyjmuty z těla larvy nebo kukly ve fyziologickém roztoku, poté přemístěny na sklíčko s miniaturní kapkou fyziologického roztoku a převrstveny fixačním roztokem Carnoy. Po přibližně 30 vteřinách byla odstraněna nadbytečná fixáž a materiál byl obarven přidáním kapky 1,25% lakto-aceto-orceinu. Po přikrytí krycím sklíčkem byly odstraněny přebytky barviva pomocí kousků filtračního papíru, krycí sklo bylo připevněno lakem na nehty a preparát byl uskladněn v 4°C po dobu maximálně dvou týdnů.

3.3. Přípravy pro komparativní genomovou hybridizaci (CGH)

3.3.1. Izolace DNA

Vzhledem k tomu, že cílem bylo získat co největší množství DNA, byla vybraná metoda izolace celogenomové DNA pomocí CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromid) (Winnepenninckx, Backeljau, a Wachter 1993). Materiál z jednoho jedince byl homogenizován tloučkem v 800 μ l extrakční pufru (složení viz tabulka č.1) v 1.5ml zkumavce a inkubován v termobloku přes noc (60°C, 300 rpm).

Tabulka č.1: Extrakční pufr pro izolaci DNA.

Chemikálie	Množství na 10 ml	Výsledná koncentrace
CTAB	0,2 g	2%
1M Tris HCl (pH 8)	1 ml	100mM
5M NaCl	2,8 ml	1,4M
0,5M EDTA (pH 8)	0,8 ml	40mM
β -merkaptoetanol	20 μ l	0,2%
proteínáza K (20 mg/ml)	50 μ l	0,1 mg/ml

Příprava extrakčního pufru: CTAB inkubovat ve vodě při 37°C do úplného rozpuštění. Poté přidat ostatní složky dle rozpisu v tabulce. β -merkaptoetanol a proteinázu K je potřeba přidat až těsně před použitím pufru.

Druhý den byl obsah zkumavky přemístěn do 2ml zkumavek a ke vzorku se přidalo stejné množství (800 μ l) chloroformu. Po jemném promíchání byly vzorky centrifugovány (4°C, 14000 rpm) po dobu 10 minut. Výsledná horní fáze s DNA byla přepipetována do nových zkumavek a centrifugace byla zopakována za stejných podmínek. Po tom byla opět odebrána horní fáze, ke které bylo přidáno 50 μ g RNázy A a po jemném promíchání byl vzorek inkubován při 37°C po dobu 30 minut. Následně byly přidány 2/3 objemu isopropanolu, vzorek byl promíchán a ponechán 15 minut až 3 hodiny při pokojové teplotě do objevení klubka vysrážené DNA. Dále následovala centrifugace (4°C, 14000 rpm) po dobu 15 minut, odstranění supernatantu a přidání 500 μ l 70% etanolu. Vzorek byl následně promíchán a centrifugován (4°C, 14000 rpm) po dobu 5 minut. Po opakování tohoto promývacího kroku byl supernatant důkladně odstraněn a DNA byla rozpuštěna v 20-100 μ l (podle velikosti peletu) sterilní miliQ vody. Výsledná koncentrace vzorku byla změřena na flourometru Qubit 3.0 a spektrofotometru Nanodrop 2000 (obojí ThermoScientific, Waltham, USA)

3.3.2. Příprava celogenomových sond

Pro značení celogenomové DNA byla použita metoda nick translace, která je založena na narušení řetězce DNA pomocí DNázy I a jeho následné náhradě DNA polymerázou I za přítomnosti značených nukleotidů.

Reakční směs o objemu 20 μ l (složení viz tabulka č.2) byla inkubovaná v termocycleru 2 hodiny při 15°C. Poté byly enzymy inaktivovány 10 minut při 70°C a 2 μ l vzniklého produktu byly použity na kontrolu velikosti sondy, která by měla být ideálně kolem 500 bází, pomocí elektroforézy. Takto připravené sondy byly skladovány při -20 °C až do dalšího použití.

Tabulka č.2: Směs pro Nick-translaci.

Chemikálie	Množství na 20 μ l reakční směsi	Výsledná koncentrace
10x NT pufr (0,05M TrisHCl (pH 7,5), 5mM MgCl ₂ , 0,005% BSA)	2 μ l	5mM TrisHCl (pH 7,5), 0,5mM MgCl ₂ , 0,0005% BSA
0,1M β -merkaptoetanol	2 μ l	0,01M
dNTP (0,5mM dATP, dCTP a dGTP; 0,1 mM dTTP)	2 μ l	0,05mM dATP, dCTP a dGTP; 0,01mM dTTP)
1mM fluorescein dUTP- /1mM dUTP-Cy3 (Jena Bioscience)	0,4 μ l	0,02mM
DNA polymeráza I (10 U/ μ l) (ThermoFisher Scientific)	2 μ l	1 U/ μ l
DNáza I (0,01 U/ μ l) (ThermoFisher Scientific)	0,5 μ l	$2,5 \times 10^{-4}$ U/ μ l
H ₂ O	11,1 μ l – objem DNA	
DNA	300 ng	

3.3.3. CGH - Komparativní genomová hybridizace

Tato metoda se používá na zjištění rozdílů ve dvou různých genomech, v tomto případě na detekci chromosomu W kroupnatce jetelového. Princip metody je ten, že se na samičí chromosomální preparát nanese různě naznačené celogenomové sondy ze samečka a samičky. Obě sondy hybridizují na komplementární místa na chromosomech, a pokud je přítomen chromosom W, který se vyskytuje pouze v samičím genomu, měl by být zvýrazněn samičí sondou.

Hybridizační směs byla připravena smícháním následujících složek v 1,5ml zkumavce: 300 ng samčí celogenomové sondy značené červeným fluorochromem Cy3, 300 ng samičí celogenomové sondy značené zeleným fluorochromem fluoresceinem, 25 μ g DNA z lososích

spermií, 1/10 celkového objemu 3M octanu sodného (pH 8,0) a 2,5násobné množství chlazeného 100% etanolu (-20°C). Směs byla po dobu 15 minut uchována v -20°C, aby došlo k precipitaci DNA. Následně byla směs centrifugována (4°C, 14000 rpm) po dobu 15 minut. Poté byl odstraněn supernatant, k peletu bylo přidáno 200 µl 70% etanolu a důkladně promícháno na vortexu. Následovala centrifugace (4°C, 14000 rpm) po dobu 5 minut. Supernatant byl opatrně odsán do sucha, k peletu bylo přidáno 5 µl deionizovaného formamidu a ponecháno inkubovat při 37°C po dobu 30 minut. Poté by přidáno 5 µl 20% dextran sulfátu v 4x SSC a vzorek byl denaturován 5 minut při 90°C a hned potom prudce zchlazen na ledu. Připravená hybridizační směs byla prehybridizována při 37°C 1,5 hodiny.

Paralelně byl připraven chromosomální preparát, a to nejdříve postupným odvodněním v etanolové řadě (70%, 80% a 100% po dobu 1 minuty v každém). Poté následovalo předpůsobení 25 µg RNázy A v 2x SSC, kdy byl preparát inkubován ve vlhké komůrce (uzavřená krabička s vrstvou papírové utěrky s 2x SSC) při 37°C hodinu. Poté následovala dvě promytí v 2x SSC v pokojové teplotě. Denaturace chromosomů byla provedena tak, že na preparát bylo nanášeno 100 µl 70% deionizovaného formamidu v 2x SSC, přikryto krycím sklem 24x50 mm a ponecháno denaturovat v termobloku přesně 3,5 minuty při 68°C. Hned po uplynutí času byl preparát prudce ochlazen v chladném 70% etanolu (-20°C) po dobu 1 minuty a následně odvodněn v 80% a 100% etanolu (30 vteřin v každém). Po uschnutí byl preparát připraven na nanášení prehybridizované hybridizační směsi.

Po dokončení prehybridizace byla hybridizační směs krátce zcentrifugována, nanášena na připravený denaturovaný preparát, a přikryta krycím sklíčkem 24x32 mm. Hrany krycího skla byly zalepeny lepidlem Rubbercement (Marabu) a preparát byl přenesen ve vlhké komůrce do 37°C na dobu 3 dnů.

Po uplynutí inkubační doby bylo z preparátu odstraněno krycí sklo a preparát byl 5 minut promýván ve vodní lázni při 62°C v 1% roztoku Tritonu v 0,1xSSC (Sigma-Aldrich, USA). Poté byl preparát hned vložen do kyvety s 1% Kodak PhotoFlo (Kodak) v miliQ vodě a promýván při pokojové teplotě 1 minutu. Po krátkém oschnutí bylo na preparát nanášeno 25 µl směsi DABCO s DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) (500 ng/ µl) (obojí Sigma-Aldrich, USA) a překryt krycím sklíčkem 24x40 mm. Nakonec byl přebytek DABCO

odstraněn vytlačení do filtračního papíru a okraje krycího skla byly připevněny lakem na nehty. Hotový preparát byl uchován v ledničce při 4°C do následného prohlídnutí.

3.4. Genomová in situ hybridizace – GISH

Jedná se o jednu z variant hybridizace in situ s hybridizací pouze jedné značené celogenomové sondy. Tato metoda nám umožnila zaměřit se přímo na pohlavní chromosom W.

Jako kompetitorová DNA byla použita celogenomová samčí DNA, která byla inkubována 20 minut při 90°C. Příprava hybridizační směsi byla následující: 300 ng červeně naznačené samičí sonda bylo smícháno v 1,5ml zkumavce se 3 µg samčího kompetitora, 25 µg DNA z lososích spermií, 1/10 celkového objemu 3M octanu sodného (pH 8,0) a 2,5násobné množství chlazeného 100% etanolu (-20°C). Všechny další kroky (a to i příprava chromosomálních preparátů, hybridizace a promývání) byly stejné jako u CGH až na prehybridizaci sondy, která byla u GISH vynechána.

3.5. Prohlížení preparátů

Preparáty malpigických trubic byly prohlíženy a dokumentovány na mikroskopu Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss Jena, Německo) pod objektivy 40x a 63x. Preparáty po CGH a FISH metodách byly prohlíženy a dokumentovány na tomtéž mikroskopu pod objektivy 63x a 100x za použití 3 barevných filtrů: zelený pro samičí celogenomovu sondu, červený pro samčí celogenomovu sondu, modrý pro podbarvení chromosomů pomocí DAPI. Pro získání černobílých snímků byla využita kamera Olympus CCD XM10 s programem cellSens 1.9 (Olympus, Německo). Všechny obrázky byly upravené a složeny v programu Adobe Photoshop CS6, verze 13.0.

3.6. Polymerázová řetězcová reakce na detekci bakterie rodu *Wolbachia*

Základem PCR je opakovaná denaturace a následná renaturace rozvolněných dvouřetězcových molekul DNA za přítomnosti oligonukleotidových primerů, komplementárních k hranicím

amplifikované sekvenční. Od primerů začíná syntéza nových řetězců DNA pomocí termostabilní DNA polymerázy.

Reakční směs polymerázové řetězcové reakce o objemu 25 µl (složení viz tab. č.3) obsahovala primery specifické pro wolbachii (wsp_F1: GTCCAATARSTGATGARGAAAC a wsp_R1: CYGCACCAAYAGYRCTRATAA). Profil PCR reakce byl následující: iniciální denaturace 2 minuty při 94°C, následována 34 cykly: denaturace 30 sekund při 94°C, nasedání primerů (annealing) 45 sekund při 59°C a extenze 1 minutu při 72°C. Poté následovala finální extenze 10 minut při 72°C a zchlazení na 4°C. Pozitivní kontrola kvality DNA se prováděla v separátní reakci pomocí amplifikace části genu pro elongační faktor 1 alfa (EF_F:5'–CACATYAACATTGTCGTSATYGG –3' a EF_R:5'–CATRTTGTCCKCCGTGCCARCC –3') se stejným profilem reakce, jen teplota nasedání primerů byla 56°C. Oba páry primerů byly poskytnuty jinými členy laboratoře. PCR produkty byly elektroforeticky separovány na 1,5% agarózovém gelu, obarveny ethidium bromidem a zdokumentovány ve fotodokumentačním zařízení pod UV zářením.

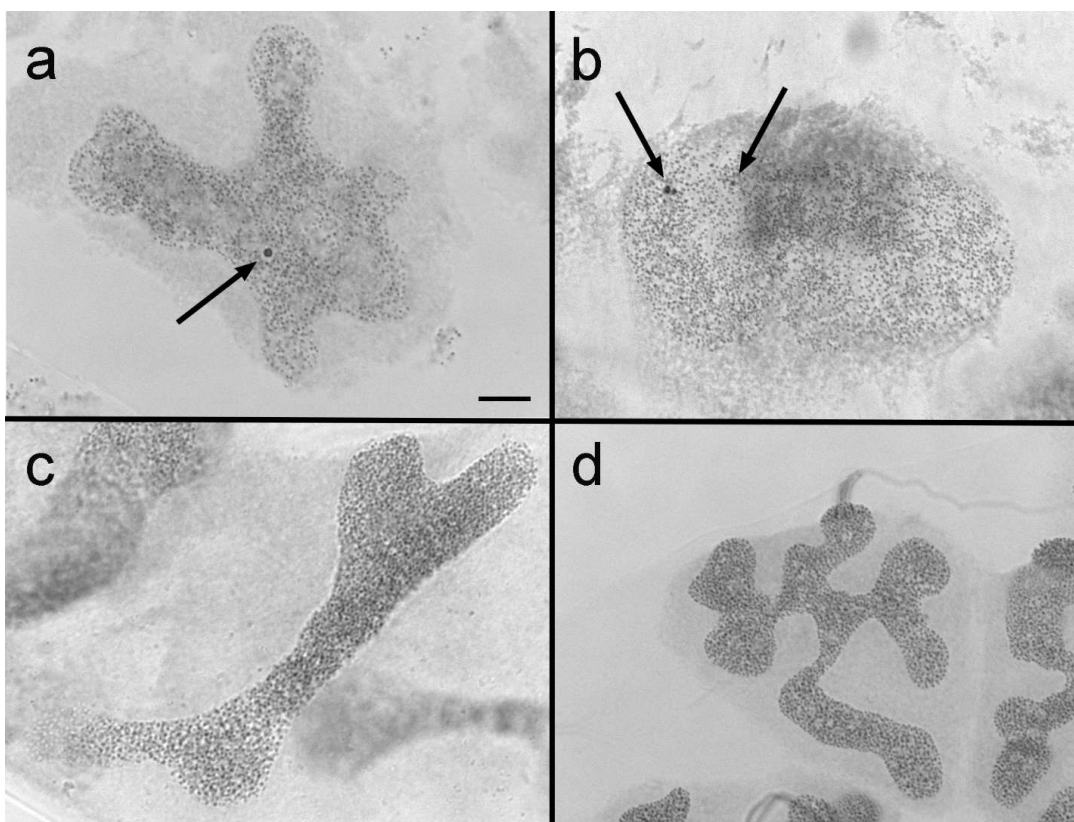
Tabulka č.3: Složení PCR směsi.

Chemikálie	Množství na 25 µl reakční směsi	Výsledná koncentrace
5x OneTaq pufr	5 µl	1x
dNTP (2,5mM dATP, dCTP, dGTP a dTTP)	2 µl	0,2mM
Primery (10µM forward a reverse)	2,5 µl	1µM
OneTaq DNA polymeráza 1 (5 U/µl) (New England, BioLab, USA)	0,2 µl	0,04 U
H ₂ O	11,8 µl	
DNA	100 ng	

4. Výsledky

4.1. Přítomnost sex chromatinu

Veškeré potomstvo rodin, uvedených v tabulce č. 4, bylo testováno na přítomnost heterochromatinových tělísek v interfázích jádrech malpighických žláz. Jak bylo uvedeno výše, sex chromatin je tvořen kopiemi chromosomu W, což znamená, že by ho měly mít pouze samičky s konfigurací WZ. Analýza jader malpighických žláz ukázala variabilitu v přítomnosti a podobě sex chromatinu, kdy některé rodiny sex chromatin měly (jenom samičky) a vzhled byl variabilní (velký kulatý, menší velikosti, fragmentovaný), a některé rodiny ho neměly vůbec (tj. chyběl u samic i samců) (obr.3). Sex chromatin nebyl pozorován u žádného z 20 vyšetřených samců.



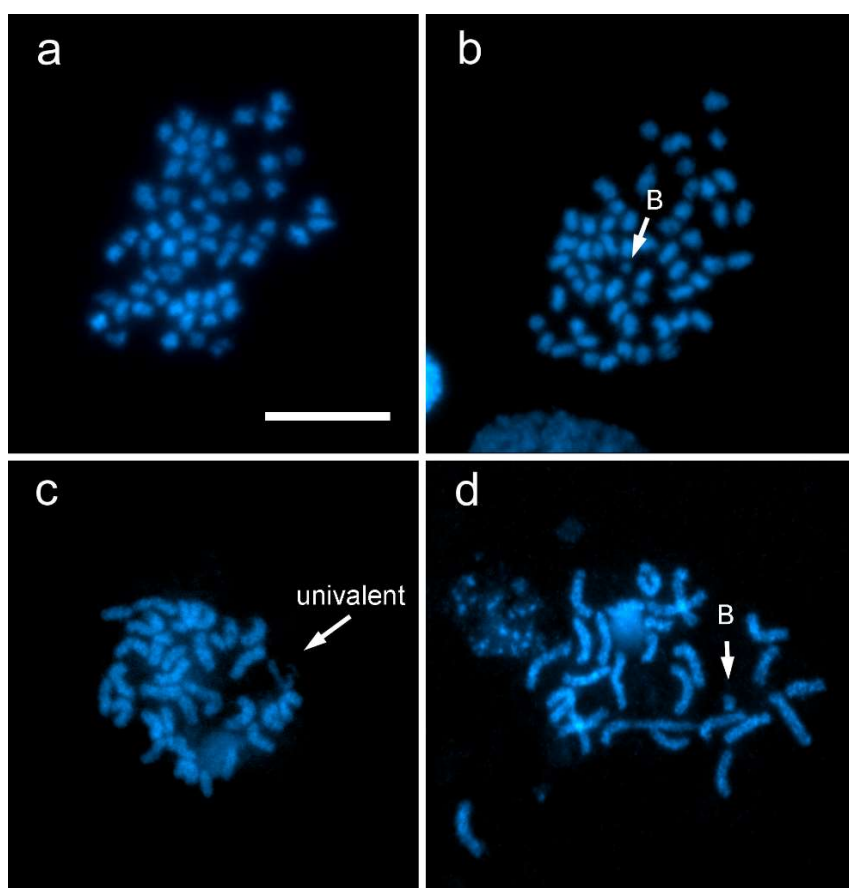
Obr. 3: Polyploidní interfázní jádra malpighických žláz barvená lakto-aceto-orceinem s a bez sex chromatinu (SC). Jádro ♀ z rodiny CZ-F19-01 s jedním kulatým tělískem SC (a), jádro ♀ z rodiny CZ-F18-14 s SC fragmentovaným do více menších tělísek (b), jádro ♀ z rodiny CZ-F19-04 bez SC (c), jádro ♂ z rodiny CZ-18-02 bez SC (d). Měřítka = 10 μ m.

Tabulka č. 4: Seznam analyzovaných rodin *Chiasmia clathrata*.

Rok	Rodina	Sex chromatin	Lokalita
2018	EST-F01 (ALV2)	SC+	Estonsko
	EST-F02 (ALV5)	SC-	Estonsko
	EST-F03 (JI)	SC+	Estonsko
	Ccla-EST-18-01-01	SC+	Estonsko
	CZ-F01	variabilní	Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou)
	CZ-F03	variabilní	Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou)
	CZ-F12	variabilní	Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou)
	CZ-F14	SC+	Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou)
	CZ-F15	SC+	Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou)
	CZ-F16	SC-	Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou)
2019	ET1	SC+	Estonsko, Karilatsi
	ET2	SC+	Estonsko, Karilatsi
	ET3	SC+	Estonsko, Karilatsi
	ET4	SC+	Estonsko, Karilatsi
	ET5	SC+	Estonsko, Karilatsi
	ET6	SC+	Estonsko, Karilatsi
	ET7	SC+	Estonsko, Karilatsi
	CZ-F01	SC+	Vrbenské rybníky, České Budějovice
	CZ-F02	SC+	Vrbenské rybníky, České Budějovice
	CZ-F03	SC-	Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou)
	CZ-F04	SC-	Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou)
	CZ-F05	SC-	Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou)
	CZ-F06	SC-	Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou)
	CZ-F08	SC-	Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou)

4.2. Mitotické a meiotické chromosomy barvené DAPI

Počítání chromosomů bylo provedeno na několika mitotických preparátech (obr. 4) z křídelních disků samic kropenatce jetelového. Celkem byly vyšetřeny dva preparáty z roku 2018 na rodinách se sex chromatinem (SC^+): CZ-18-01, CZ-18-03 a jeden z roku 2019 z rodiny bez sex chromatinu (SC^-): CZ-19-4. Cílem bylo najít potenciální rozdíl v počtu chromosomů u rodiny se sex chromatinem a bez sex chromatinu. Výsledky nebyly jednoznačné: 5 jader ze samice CZ-18-01 obsahovalo 60 chromosomů, 4 jádra - 58 a nejčastěji vyskytující číslo bylo 59 (7 jader). Preparát CZ-18-03 v některých jádrech jevil náznaky B-chromosomu (obr. 2). Z preparátu CZ-19-04 byla hodnocena 2 jádra s 60 chromosomy a 3 s počtem 59.



Obr. 4: Mitotické a meiotické chromosomy ze samic *C. clathrata* obarvené DAPI. Mitotické chromosomy CZ-18-01 (a) a CZ-18-03 s B-chromosomem (b) a meiotické chromosomy CZ-19-04 (c) s vyznačeným univalentem a CZ-F19-08 s B-chromosomem (d). Měřítko = 10 μ m.

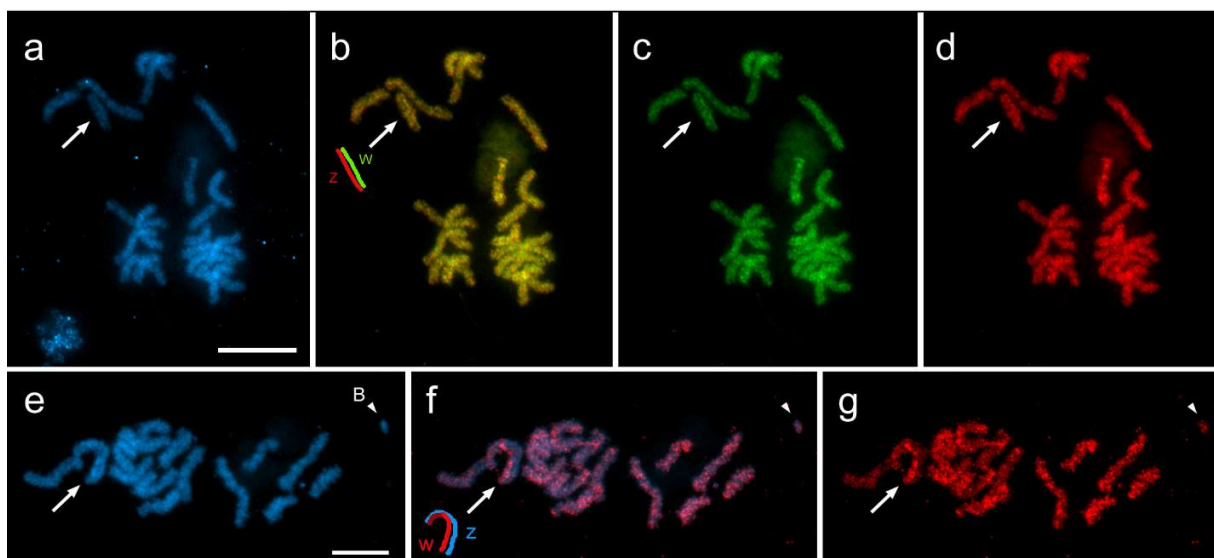
Meiotické preparáty z ovarii samic ze dvou rodin SC⁻: CZ-F19-04 a CZ-F19-08, a jedné rodiny SC⁺: CZ-F18-03 obsahovali ve většině svých jader nadbytečné chromosomy B (obr. 4). U preparátu CZ-F19-04 (SC⁻) i několika jiných z rodiny č. 8 (SC⁻) byl navíc nalezen univalent v několika jádrech (obr. 4). Výsledné počty bivalentů v prohlednutých preparátech meiotických jader barvených DAPI byly variabilní a pohybovaly se mezi 30-32.

Pomocí barvení DAPI se nepodařilo identifikovat chromosom W v mitotických ani meiotických jádrech. V některých pachytenních jádrech oocytů ze samice bez SC byl patrný univalent (Obr. 4c), tato jádra ale představovala výraznou menšinu. Poměrně často byly v jádrech samic s i bez SC identifikovány B-chromosomy, které byly výrazně menší než ostatní chromosomy (Obr. 4b a 4d).

4.2. CGH a GISH

Přítomnost chromosomu W byla ověřena pomocí dvou metod: CGH a GISH, z nedostatku času pouze na preparátech samic z rodin se sex chromatinem (SC⁺). V případě CGH obě sondy hybridizovaly ke všem chromosomům srovnatelně. Samičí sonda nezvýraznila žádnou oblast na žádném chromosomu, která by obsahovala sekvence unikátní nebo obohacené na W (obr. 5a-d). U drtivé většiny jader nebylo možné rozpoznat chromosom W. CGH byla opakována 7x z důvodu často špatné hybridizace samičí sondy, kterou se opakovaně nedařilo dostatečně naznačit.

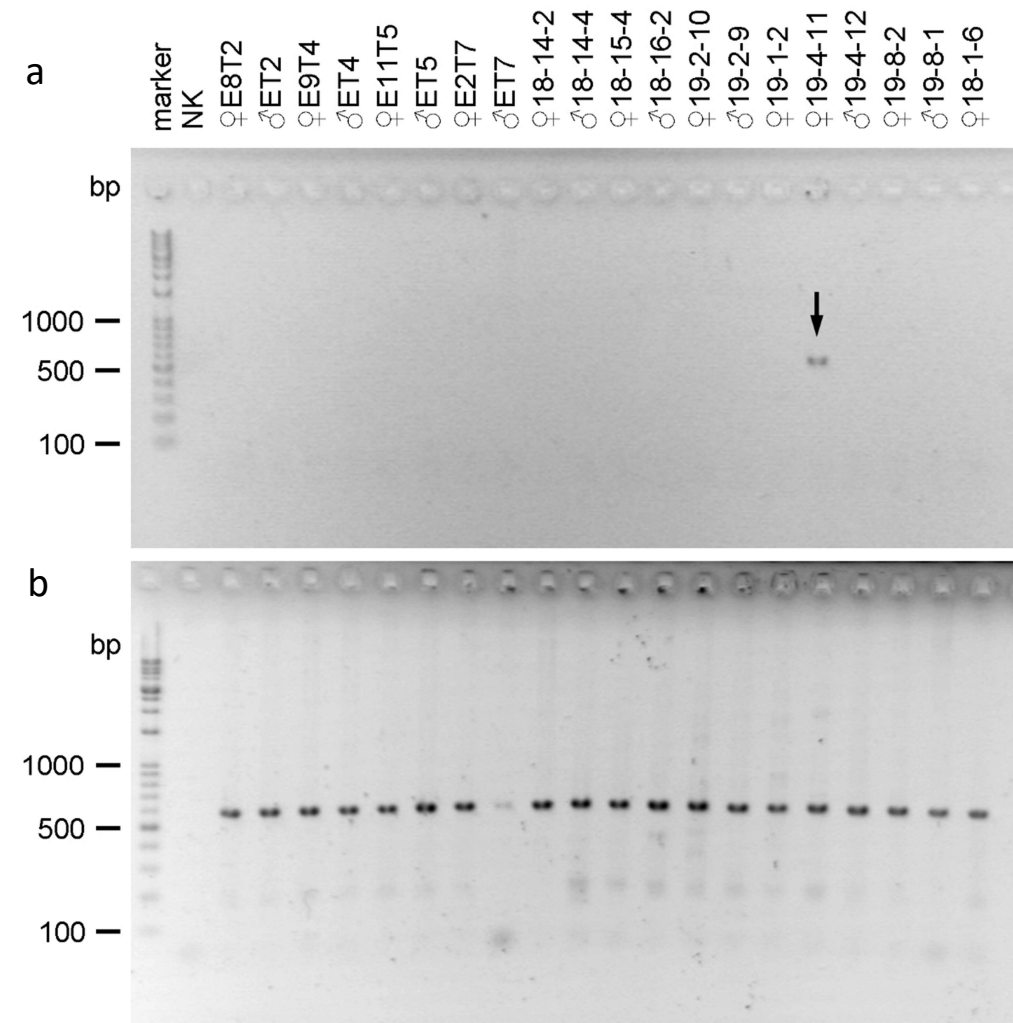
V případě GISH byl v některých jádrech patrný bivalent, kdy byl jeden chromosom (W) naznačen samičí sondou výrazně více než jeho partner (Z). Chromosom W byl samičí sondou zvýrazněn jen z části (cca 2/3), zatímco zbytek chromosomu byl naznačen srovnatelně s jinými chromosomy (obr. 5e-g).



Obr. 5: Komparativní genomová hybridizace na pachytenních oocytech ♀ CZ-18-15 (a-d) a genomová in situ hybridizace, nekompletní pachytenní jádro ♀ CZ-19-02 (e-g). Podbarvení DAPI (a, e), překryv samičí a samčí sondy (b), samičí sonda značená zeleně (c), samčí sonda značená červeně (d), překryv samičí sondy a DAPI (f), samičí sonda značená červeně (g). Šipka ukazuje na bivalent WZ, hlavička šipky na B-chromosom. Schémata na obrázcích b a f ukazují pozice chromosomů W a Z v bivalentu. Měřítko = 10 μ m.

4.3. Detekce přítomnosti bakterie rodu *Wolbachia* pomocí PCR

Cílem použití polymerázové řetězcové reakce bylo zjistit, zda absence sex chromatinu v malpighických žlázách některých rodu (a tím potenciálně i absence chromosomu W) je ovlivněna přítomností bakterie rodu *Wolbachia*. Při kontrole PCR produktů se ukázalo, že ze 20 vzorků jenom jeden měl produkt o správné délce, a to samička z rodiny CZ-19-04 (obr. 6a). Kvalita DNA byla ověřena pomocí pozitivní kontroly (elongační faktor) (obr. 6b).



Obr. 6: PCR produkty elektroforeticky separované na 1,5% agarózovém gelu. PCR produkty získané pomocí *wsp* primerů na detekci přítomnosti wolbachie. Produkt očekávané délky byl získán pouze u samice z rodiny CZ-19-04 (a). PCR produkty získané pomocí primerů pro gen pro elongační faktor 1 alfa, které sloužily jako kontrola kvality genomové DNA použité jako templát do PCR reakcí (b). NK = negativní kontrola, tj. PCR reakce bez templátové DNA.

5. Diskuze

Chiasmia clathrata je cytogeneticky neprozkoumaný druh píďalky, u kterého předběžná analýza ukázala variabilitu přítomnosti a podoby sex chromatinu u různých rodin. Cílem práce bylo získat veškerou možnou informaci o karyotypu, otestovat hypotézy o příčině variability přítomnosti sex chromatinu a rozvinout varianty dalšího postupu.

5.1. Variabilita v samotné přítomnosti chromosomu W v rámci druhu *C. clathrata*

Nejjednodušší vysvětlení variability v přítomnosti sex chromatinu u *C. clathrata* je přítomnost chromosomu W u některých samic (WZ) a jeho absence u jiných (Z0). U motýlů byla variabilita v pohlavních chromosomech pozorována např. u vakonoše *Dahlica triquetrella* nebo u bělásků rodu *Leptidea* (Šíchová et al. 2015; Robinson 1970)

U rodin *C. clathrata*, které postrádaly sex chromatin, byl v některých pachytenních jádrech nalezen univalent, čili chromosom, který se během meiotické profáze I nepáruje s jiným chromosomem. Přítomnost univalentu je typickým projevem absence chromosomu W nebo Y, u motýlů byl nalezen např. u chrostíkovníka *Micropterix calthella* (Micropterigidae) nebo vakonošů (Psychidae) (Hejníčková et al. 2019; Traut a Marec 1997) V tomto případě by se mohlo jednat u univalent chromosomu Z a důkaz absence chromosomu W. Tento univalent byl bohužel pozorován jen u několika jader, je tedy možné, že se ve skutečnosti jedná o B-chromosom.

Možné řešení (další postup): Z časových důvodů nebyly připraveny chromosomální preparáty ze samců. Nalezení univalentu v samčích pachytenních jádrech by vyloučila, že se jedná o univalent chromosomu Z, protože u samců se chromosom Z vyskytuje ve dvou kopiích, které v pachytene tvoří bivalent.

5.2. Variabilita ve struktuře chromosomu W s rámci druhu *C. clathrata*

Pokusy s mutantními liniemi zavíječe moučného, které zahrnovaly fúze, delece a translokace pohlavních chromosomů, stejně tak jako chromosomy neo-W objevené u *P. californicus* a *P. mnemosyne* ukázaly, že některé chromosomální přestavby mohou ovlivnit přítomnost a podobu sex chromatinu. Přítomnost transkripčně aktivní části z bývalého autosomu na neo-W zřejmě interferuje s formováním sex chromatinu, což může vést k jeho absenci (Vlašánek et al. 2017; Voleníková 2015; Traut a Marec 1994; Traut, Weith a Traut 1986). Proměnlivost v přítomnosti sex chromatinu tedy může naznačovat, že se jedná o různé konfigurace pohlavního chromosomu uvnitř tohoto druhu: některé rodiny mohou mít původní chromosom W a některé rodiny mají neo-W, který vznikl fúzí původního chromosomu W s autozomem (Voleníková 2015; Šichová et al. 2013).

Chromosom W je u motýlů často tvořen heterochromatinem a je dobře patrný pod světelným mikroskopem nebo po barvení DAPI (Traut et al. 2013; Sahara, Yoshido, a Traut 2012; Fuková et al. 2007). U *C. clathrata* chromosom W není tvořen heterochromatinem, což značně ztěžuje jeho pozorování a analýzu. Metody molekulární cytogenetiky, jako je CGH nebo GISH, mohou identifikovat chromosom W pomocí složení, kterým se liší od chromosomu Z. CGH u rodin se sex chromatinem (SC⁺) nedokázala identifikovat pohlavní chromosomy, což bylo patrně způsobeno nedostatečnou kvalitou samičí sondy, která při CGH opakovaně selhávala, v kombinaci s malými rozdíly mezi chromosomy W a Z. U GISH samičí sonda úspěšně identifikovala chromosom W v některých pachytenních jádrech, kde byl patrný rozdíl v hybridizaci sondy na W a na Z. Zajímavé je, že sonda výrazněji hybridizovala k přibližně 2/3 chromosomu W, zatímco zbývající třetinu označila se srovnatelnou intenzitou jako autosomy. Podobné výsledky byly nalezeny u obalečů *Lobesia botrana* a *Eupoecilia ambiguella* (Šichová et al. 2013), nebo u výše zmíněných *P. mnemosyne* a *P. californicus* (Vlašánek et al. 2017; Voleníková 2015), kde na chromosomech neo-W byla intenzivněji naznačena část z původního chromosomu W a slaběji zatím málo degenerovaná část pocházející z autosomu.

Možné řešení (další postup):

a) Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) s malovací sondou vytvořenou ze sex chromatinu

Malovací sonda (vytvořená pomocí laserové mikrodisekce sex chromatinu z preparátů jader malpighických žláz podle Fuková et al. (2007)) by měla pomocí FISH detekovat chromosom, z něhož byla získána, v tomto případě pravděpodobně chromosom W. Princip metody spočívá v navázání sondy na komplementární místa na chromosomech, v tomto případě na chromosom W (pokud je přítomen), alternativně na B-chromosom, pokud je sex chromatin ve skutečnosti odvozen z B-chromosomů (Voleníková 2012; Traut, Sahara a Marec 2008). Výhodou tohoto přístupu by bylo vyřešení problému, zda je sex chromatin ve skutečnosti tvořen nadbytečnými B-chromosomy, a pokud je tvořen chromosomem W, pak by byla jednoznačně vyřešena otázka, zda je chromosom W přítomen u rodin bez sex chromatinu.

b) Komparativní analýza genomů samců a samic z rodin s a bez sex chromatinu

Porovnání osekvenovaných genomu samic a samců z rodin, lišících v přítomnosti sex chromatinu, by umožnilo detekovat sekvence, které jsou specifické pro chromosom W nebo na chromosomu W obohacené, případně získat sekvence z B-chromosomů.

5.3. Feminizace části samců, způsobená bakterií rodu *Wolbachia*

Další teorie, která by vysvětlila variabilitu v přítomnosti sex chromatinu u *C. clathrata*, je teorie o přítomnosti vnitrobuněčného parazita *Wolbachia*, která způsobuje feminizaci genetických samců. Jedinci, kteří sex chromatin nemají, by byli feminizovaní genetičtí samci s chromosomy ZZ nebo Z0. Bakterie byla nalezena pouze u jednoho jedince z rodiny bez sex chromatinu (SC⁻), což naznačuje, že variabilita sex chromatinu není způsobena *Wolbachii*, respektive pokud ano, tak pouze u této jediné rodiny. Může se ale jednat o jiného vnitrobuněčného parazita, který ovládá jev feminizace samce: třeba méně často se vyskytující bakterie rodu *Cardinium* (Cordaux, Bouchon a Grève 2011).

Možné řešení (další postup): real-time PCR (qPCR) pro stanovení genové dávky

Metoda je založena na tom, že se po každém cyklu reakce odečítá množství produktu díky inkorporování fluorochromové barvy do vzorku. Tím pádem je vidět postupnou amplifikaci DNA pomocí fluorescenčního signálu. Porovnání amplifikace sekvence z chromosomu Z a referenční sekvence z autosomu by mělo umožnit rozlišení samic ZZ feminizovaných samců od WZ/Z0 samic, ale pouze za předpokladu, že chromosomy W a Z jsou dobře diferenciované.

5.4. Další možné příčiny variability sex chromatinu u *C. clathrata*

5.4.1. B-chromosomy

B-chromosomy jsou nadbytečné chromosomy, které se vyskytují ve variabilním počtu uvnitř druhu, nemusí být v každém jádře a ani v každém jedinci (Douglas a Birchler 2017; Pansonato-Alves et al. 2014). Protože svojí strukturou často připomínají chromosom W, mohou se podílet na tvorbě heterochromatinových tělísek v polyploidních buňkách malpighických žláz (Voleníková 2012). Na rozdíl od sex chromatinu, který je tvořen chromosomem W, a vyskytuje se tak jen u samic, B-chromosomy se vyskytují u obojího pohlaví a jimi tvořená heterochromatinová tělíška by tak měli mít i samci.

O přítomnosti B-chromosomů u *C. clathrata* svědčí variabilní počet chromosomů na mitotických preparátech, tak útvary připomínající malé chromosomy viditelné v pachytene. B-chromosomy by tak mohly být zodpovědné za variabilitu sex chromatinu uvnitř některých rodin, kde jsou jak jedinci se sex chromatinem (SC⁺), tak i bez (SC⁻). Tuto teorii zpochybňuje fakt, že i po vyšetření mnoha samců (a to u obou rodin SC⁺ a SC⁻), žádný nevykazoval přítomnost heterochromatinových tělísek v jádrech malpighických žláz. Navíc B-chromosomy byly objeveny i u rodin bez sex chromatinu, takže by neměly být zodpovědné ani za tvorbu tělísek u rodin se sex chromatinem. Na druhou stranu nelze vyloučit přítomnost více druhů B-chromosomů, které se liší složením a vlastnostmi.

5.4.2. Kryptické druhy

Od prvních pokusu sekvenování mitochondriální DNA (mtDNA) stoupal počet nalezených kryptických druhů (Hinojosa et al. 2019). Jen ve skupině Lepidoptera se ukázalo, že kryptické taxony představují významný zlomek celkové rozmanitosti (Hinojosa et al. 2019; Dincă et al. 2011). Např. v Evropě téměř 28% druhů motýlů zahrnuje velice rozlišné intraspecifické mitochondriální rodokmeny (Dincă et al. 2015). Další možností, která by tedy mohla být zodpovědná za variabilitu sex chromatinu, je to, že druh *C. clathrata* ve skutečnosti zahrnuje kryptické druhy, které se liší karyotypem, což bylo pozorováno u druhu bělásků rodu *Leptidea* (Dincă et al. 2011).

Možné řešení (další postup): sekvenování mitochondriální DNA

Princip identifikace kryptických druhů je založen na sekvenování a fylogenetické analýze cytochrom oxidázové podjednotky I (COI), což je velice variabilní usek, který by měl být schopný rozlišit dva různé druhy, zároveň není příliš variabilní v rámci druhu (Hinojosa et al. 2019). Teorii o kryptických druzích by podpořila fylogenetická analýza COI, která by všechny rodiny se sex chromatinem (SC⁺) řadila do jedné skupiny a bez sex chromatinu (SC⁻) do druhé.

6. Závěr

Kropenatc jetelový (*C. clathrata*) je píďalka s variabilní přítomností a podobou sex chromatinu (SC) v polyploidních jádrech samic. Cílem této práce bylo zjistit příčinu variability sex chromatinu u tohoto druhu otestováním několika pracovních hypotéz, konkrétně (1) variabilita v přítomnosti chromosomu W, (2) variabilita v podobě chromosomu W, (3) přítomnost vnitrobuněčné bakterie rodu *Wolbachia* manipulující pohlavím hostitele.

Analýza polyploidních interfázních jader samic rozdělila rodiny na dvě skupiny: se sex chromatinem (SC⁺) a bez (SC⁻), s tím, že byla nalezena variabilita i uvnitř rodiny. U samců nebyly nalezeny žádné náznaky sex chromatinu. S určitou mírou jistoty dá se říct, že bakterie rodu *Wolbachia* není za variabilitu sex chromatinu zodpovědná, jelikož byla nalezená pouze u jednoho jedince rodiny bez sex chromatinu (SC⁻). Komparativní genomová hybridizace neidentifikovala žádnou oblast chromosomu W specifickou pro samici. Zajímavé výsledky přinesla genomová in situ hybridizace, která detekovala WZ bivalent u rodiny se sex chromatinem (SC⁺). Analýza mitotických a meiotických chromosomů odhalila jejich variabilní počet u samic jak z rodin se sex chromatinem, tak i bez, a odhalila přítomnost B-chromosomů. V některých pachytenních jádrech oocytů u rodiny bez sex chromatinu (SC⁻) byl navíc nalezen univalent Z nebo B chromosomu. Přítomnost B-chromosomů ale pravděpodobně není příčinou variability sex chromatinu, protože se nalézají u rodin se sex chromatinem (SC⁺) i bez (SC⁻) a sex chromatin nebyl nalezen u samců.

Příčinu variability sex chromatinu se tedy zatím nepodařilo zjistit, ale byla vyloučena jedna z pracovních hypotéz a na základě dosažených výsledků byly navrženy další směry výzkumu.

7. Použité zdroje

- Abe H., Mita K., Yasukochi Y., Oshiki T., a Shimada T.. 2005. “Retrotransposable Elements on the W Chromosome of the Silkworm , Bombyx Mori.” *Cytogenetic and Genome Research* 110: 144–51.
- Ahmed M. Z., Araujo-Jnr E. V., Welch J. J. a Kawahara A. Y.. 2015. “Wolbachia in Butterflies and Moths : Geographic Structure in Infection Frequency.” *Frontiers in Zoology* 12 (16): 1–9.
- Bachtrog D. 2006. “A Dynamic View of Sex Chromosome Evolution.” *Current Opinion in Genetics and Development* 16 (6): 578–85.
- Beldade P., Saenko S. V., Pul N., a Long A. D.. 2009. “A Gene-Based Linkage Map for Bicyclus Anyana Butterflies Allows for a Comprehensive Analysis of Synteny with the Lepidopteran Reference Genome.” *PLoS Genetics* 5 (2): e1000366.
- Carvalho A B.. 2002. “Origin and Evolution of the Drosophila Y Chromosome.” *Current Opinion in Genetics and Development* 12 (16): 664–68.
- Charlesworth B. 1978. “Model for Evolution of Y Chromosomes and Dosage Compensation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (11): 5618–22.
- Charlesworth B. 1996. “The Evolution of Chromosomal Sex Determination and Dosage Compensation.” *Current Biology* 6 (2): 149–62.
- Charlesworth B., a Charlesworth D. 2000. “The Degeneration of Y Chromosomes.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 355 (1404): 1563–72.
- Charlesworth D, Charlesworth B., a Marais G.. 2005. “Steps in the Evolution of Heteromorphic Sex Chromosomes.” *Heredity* 95 (2): 118–28.
- Chebbi M. A., Becking T., Moument B., Giraud I., Gilbert C., Peccoud J., a Cordaux R.. 2019. “The Genome of Armadillidium Vulgare (Crustacea, Isopoda) Provides Insights into Sex Chromosome Evolution in the Context of Cytoplasmic Sex Determination Mohamed.” *Molecular Biology and Evolution* 36 (4).

- Cordaux R., Bouchon D., a Grève P.. 2011. “The Impact of Endosymbionts on the Evolution of Host Sex-Determination Mechanisms.” *Trends in Genetics* 27 (8): 332–41.
- Dalíková M., Zrzavá M., Hladová I., Nguyen P., Šonský I., Flegrová M., Kubí S., et al. 2017. “New Insights into the Evolution of the W Chromosome in Lepidoptera.” *Journal of Heredity*, no. September: 1–11.
- Dincă V., Backström N., Dapporto L., Friberg M., García-barros E., Hebert P. D N, Hernández-roldán J, et al. 2015. “Corrigendum : DNA Barcodes Highlight Unique Research Models in European Butterflies.” *Genome* 58 (5): 163–303.
- Dincă V., Lukhtanov V. A., Talavera G., a Vila R.. 2011. “Unexpected Layers of Cryptic Diversity in Wood White.” *Nature Communications* 2 (1).
- Douglas R. N., a Birchler J. A.. 2017. “B Chromosomes.” In *Chromosome Structure and Aberrations*, edited by T. A. Bhat a A. A. Wani, 13–30.
- Fuková I., Traut W., Vítková M., Nguyen P., Kubičková S., a František M.. 2007. “Probing the W Chromosome of the Codling Moth , *Cydia Pomonella* , with Sequences from Microdissected Sex Chromatin.” *Chromosoma* 116: 135–45.
- Hejníčková M., Koutecký P., Potocký P., Provazníková I., Dalíková M., Visser S., Marec F., a Zrzavá M.. 2019. “Absence of W Chromosome in Psychidae Moths and Implications for the Theory of Sex Chromosome Evolution in Lepidoptera.” *Genes* 10 (1016): 1–12.
- Hilgenboecker K., Hammerstein P., Schlattmann P., Telschow A., a Werren J. H.. 2008. “How Many Species Are Infected with *Wolbachia* ? ^ a Statistical Analysis of Current Data.” *Research Letter* 281: 215–20.
- Hinojosa J. C., Koubínová D., Szenteczki M. A., Pitteloud C., Dincă V., Alvarez N., a Vila R.. 2019. “A Mirage of Cryptic Species: Genomics Uncover Striking Mitonuclear Discordance in the Butterfly *Thymelicus Sylvestris*.” *Molecular Biology*, no. May: 1–12.
- Jeyaprakash A a Hoy M. A.. 2000. “Long PCR Improves *Wolbachia* DNA Amplification : Wsp Sequences Found in 76 % of Sixty-Three Arthropod Species.” *Insect Molecular Biology* 9 (4): 393–405.

- Kageyama, D., Ohno M., Sasaki T., Yoshido A., Konagaya T, Jouraku A, Kuwazaki S., et al. 2017. “Feminizing *Wolbachia* Endosymbiont Disrupts Maternal Sex Chromosome Inheritance in a Butterfly Species.” *Evolution Letters*, 1–13.
- Kiuchi T., Koga H., Kawamoto M., Shoji K., Sakai H., Arai Y., Ishihara G., et al. 2014. “A Single Female-Specific PiRNA Is the Primary Determiner of Sex in the Silkworm.” *Nature* 509 (7502): 633–36.
- LePage D., a Bordenstein S. R.. 2013. “Wolbachia: Can We Save Lives with a Great Pandemic?” *Trends in Parasitology* 29 (8): 385–93.
- Lukhtanov V. A. 2000. “Sex Chromatin and Sex Chromosome Systems in Nonditrysian Lepidoptera (Insecta).” *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 38 (2): 73–79.
- Marec F., a Novák K.. 1998. “Absence of Sex Chromatin Corresponds with a Sex-Chromosome Univalent in Females of Trichoptera.” *European Journal of Entomology* 95 (2): 197–209.
- Nokkala S., Grozeva S., Kuznetsova V., a Maryanska- Nadachowska A.. 2003. “The Origin of the Achiasmatic XY Sex Chromosome System in *Cacopsylla Peregrina* (Frst .) (Psylloidea , Homoptera),” *Genetica* ,327–32.
- Pansonato-Alves J. C.,Serrano É. A., Utsunomia R., Camacho J. P. M., Silva C., Vicari M. R., a Artoni R. F.. 2014. “Single Origin of Sex Chromosomes and Multiple Origins of B Chromosomes in Fish Genus *Characidium*.” *PLoS ONE* 9 (9): e107169.
- Rice W.R. 1987. “The Accumulation of Sexually Antagonistic Genes as a Selective Agent Promoting the Evolution of Reduced Recombination between Primitive Sex Chromosomes
Author (s): William R . Rice Reviewed Work (s): Published by : Society for the Study of Evolution S.” *Evolution* 41 (4): 911–14.
- Robinson R. Lepidoptera genetics. In International Series of Monographs in Pure and Applied Biology, 1st ed.; Kerkut, G.A., Ed.; Pergamon Press, Oxford: New York, NY, USA, 1970, ISBN 978-148-315-470-1.
- Sahara K., Yoshido A., a Traut W.. 2012. “Sex Chromosome Evolution in Moths and Butterflies.” *Chromosome Research* 20 (1): 83–94.

- Šíchová J., Voleníková A., Dincă V., Nguyen P., Vila R., a Sahara K.. 2015. “Dynamic Karyotype Evolution and Unique Sex Determination Systems in Leptidea Wood White Butterflies.” *BMC Evolutionary Biology*, 1–16.
- Šíchová J., Nguyen P., Dalíková M., a Marec F.. 2013. “Chromosomal Evolution in Tortricid Moths : Conserved Karyotypes with Diverged Features.” *PLoS ONE* 8 (5): 23–28.
- Steinemann S., a Steinemann M.. 2005. “Y Chromosomes : Born to Be Destroyed.” *BioEssays* 7 (10): 1076–83.
- Traut W., Eickhoff U., a Schorch J-C.. 2001. “Identification and Analysis of Sex Chromosomes by Comparative Genomic Hybridization (CGH).” *Chromosome Painting* 161: 155–61.
- Traut W., a Marec F.. 1994. “Sex Chromosome Pairing and Sex Chromatin Bodies in W-Z Translocation Strains of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera).” *Genome* 37: 426–35.
- Traut W., a Marec, F.. 1996. “Sex Chromatin in Lepidoptera.” *Quarterly Review of Biology* 71 (2): 239–56.
- Traut, W., a F. Marec. 1997. “Sex Chromosome Differentiation in Some Species of Lepidoptera (Insecta).” *Chromosomal Research* 5: 283–91.
- Traut W., Sahara K., Otto T. D., a Marec F.. 1999. “Molecular Differentiation of Sex Chromosomes Probed by Comparative Genomic Hybridization.” *Chromosoma* 108 (3): 173–80.
- Traut W., Sahara K., a Marec F.. 2008. “Sex Chromosomes and Sex Determination in Lepidoptera.” *Sexual Development* 1 (6): 332–46.
- Traut W., Vogel H., Glöckner G., Hartmann E., a Heckel D. G.. 2013. “High-Throughput Sequencing of a Single Chromosome : A Moth W Chromosome.” *Chromosome Research* 21 (5): 491–505.
- Traut, W, Weith A., a Traut G.. 1986. “Structural Mutants of the W Chromosome in *Ephestia* (Insecta, Lepidoptera).” *Genetica* 70: 69–79.
- Traut W., a Winking H.. 2001. “Meiotic Chromosomes and Stages of Sex Chromosome Evolution in Fish: Zebrafish, Platyfish and Guppy.” *Chromosome Research* 9 (8): 659–72.

- Traut W.. 1976. "Pachytene Mapping in the Female Silkworm , *Bombyx Mori* L . (Lepidoptera)." *Chromosoma* 284 (58): 275–84.
- Van't Hof AE, Nguyen P., Daliková M., Edmonds N., Marec F., a Saccheri I. J.. 2013. "Linkage Map of the Peppered Moth , *Biston Betularia* (Lepidoptera , Geometridae): A Model of Industrial Melanism." *Heredity* 110 (July 2012): 283–95.
- Vítková M., Fuková I., Kubíčková S., a Marec F.. 2007. "Molecular Divergence of the W Chromosomes in Pyralid Moths (Lepidoptera)." *Chromosome Research* 15 (7): 917–30.
- Vlašánek P., Bartoňová A., Marec F., a Konvička M.. 2017. "Elusive *Parnassius Mnemosyne* (Linnaeus , 1758) Larvae : Habitat Selection , Sex Determination and Sex Ratio (Lepidoptera : Papilionidae)" 45 (180): 561–69.
- Voleníková A. 2012. "Aberantní Výskyt Heterochromatinu u Zavíječe Moučného, *Ephestia Kuehniella* (Lepidoptera)." *Bakalářská Práce, Jihočeská Univerzita*.
- Voleníková A . 2015. "Analýza Pohlavních Chromosomů Vybraných Druhů Primitivních Motýlů z Čeledi Hrotnokřídlecovití (Lepidoptera : Hepialoidea)." *Diplomová Práce, Jihočeská Univerzita*.
- Werren J. H., Windsor D., a Guo L.. 1995. "Distribution of *Wolbachia* among Neotropical Arthropods." *Royal Society* 262 (1364):
- Winnepenninckx B., Backeljau T., a Wachter R. D.. 1993. "Extraction of High Molecular Weight DNA from Molluscs." *Technical Tips* 9 (12): 407.
- Wolf K.W., Novák K., a Marec F.. 1997. "Kinetic Organization of Metaphase I Bivalents in Spermatogenesis of Lepidoptera and Trichoptera Species with Small Chromosome Numbers." *Heredity* 79 (2): 135–43.
- Yoshida K., Terai Y., Mizoiri S., Aibara M., Nishihara H., Watanabe M., Kuroiwa A., et al. 2011. "B Chromosomes Have a Functional Effect on Female Sex Determination in Lake Victoria Cichlid Fishes." *PLoS Genetics* 7 (8).
- Yoshido A., Marec F., a Sahara K.. 2016. "The Fate of W Chromosomes in Hybrids between Wild Silkmths, *Samia Cynthia* Ssp.: No Role in Sex Determination and Reproduction."

Heredity 116 (5): 424–33.

Yoshido A., Yamada Y., a Sahara K.. 2006. “The W Chromosome Detection in Several Lepidopteran Species by Genomic in Situ Hybridization (GISH).” *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* 75 (3): 147–51.

Yoshido A., Bando H., Yasukochi Y., a Sahara K. 2005. “The Bombyx Mori Karyotype and the Assignment of Linkage Groups.” *Genetics* 170 (2): 675–85.

Zrzavá M., Hladová I., Dalíková M., Šíchová J., Ůunap E., Kubičková S., a Marec F.. 2018. “Sex Chromosomes of the Iconic Moth *Abraxas*.” *Genes* 9 (279): 1–16.